

NADH И ЕЕ РОЛЬ В ИНАКТИВАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Л.В. Авдеева, Е.А. Саратовских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук, Черноголовка, Россия, tuman@cat.icp.ac.ru

Аннотация. В данном исследовании проведено изучение солей тяжелых металлов (Cu, Ni, Co, Zn, Fe), пестицидов и их комплексов с металлами на мММО из *Methylococcus capsulatus* (штамм М): мМГ и NADH-ОР. Показано, что катионы металлов оказывают ингибиторный эффект на ферменты. Наибольшее торможение ферментативной активности наблюдалось для NADH-ОР. Вероятно, такой же эффект можно ожидать и для других NADH-зависимых ферментов.

Ключевые слова: NADH, тяжелые металлы, пестициды, ферментативная активность

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1013-1017

Никотинамидадениндинуклеотид (NADH) – кофермент, имеющийся во всех живых клетках. Он является кофактором для ряда дыхательных ферментов, в частности NADH-оксидоредуктазы (NADH-ОР). NADH-ОР широко распространена в природе и входит в состав как одноклеточных, так и многоклеточных организмов. В данном исследовании нами в качестве объекта исследования была выбрана NADH-ОР из метанооксиляющих бактерий.

Метанооксиляющие бактерии (метанотрофы) широко распространены в природе и насчитывают нескольких сотен видов. Аэробные метанотрофы способны существовать и в экстремальных условиях повышенных или пониженных температур, солености и pH [Троценко, Хмеленина, 2008]. Метанотрофы являются основой бактериальных фильтров, окисляя биогенный метан, который является одним из опасных парниковых газов [Aimen et al., 2018]. Поэтому метанотрофы привлекают внимание исследователей, изучающих глобальное потепление. Суммарная реакция прямого биологического окисления метана кислородом является экзотермической и благодаря ферментам протекает с высокими скоростями и при нормальном давлении субстратов:



Уникальность метанотрофов заключается в том, что они окисляют метан до метанола при нормальных условиях. Ключевым ферментом метанотрофов является метанмонооксигеназа (ММО). ММО существует двух видов: растворимая (рММО) и мембраносвязанная (мММО). Все метанотрофы синтезируют мММО, а рММО могут синтезировать только ограниченное число штаммов. Известно, что рММО является многокомпонентным ферментным комплексом и состоит из: гидроксилазы (рМГ) со структурой $(\alpha\beta\gamma)_2$, где α -, β -, γ - субъединицы с молекулярными массами 61, 45 и 20 кДа соответственно, NADH – ОР (ММОР) с молекулярной массой 39 кДа и третьего компонента, известного как регуляторный белок (ММОВ) с молекулярной массой 16 кДа [Rosenzweig et al., 1993]. Также и мММО является ферментной системой (рис. 1), в состав которой входит мембраносвязанная метангидроксилаза (мМГ), NADH-ОР, возможно, ряд пока неизвестных переносчиков электрона и активаторов [Lieberman, Rosenzweig, 2005]. Для функционирования обоих типов ММО необходима NADH-ОР, коферментом для которой является NADH.

В последние десятилетия в результате человеческой деятельности резко возрастает в окружающей среде содержание различных токсичных веществ и соединений. В частности к ним относятся пестициды и тяжелые металлы, которые

являются техногенными ксенобиотиками. В связи с важной функцией метанотрофов в глобальном круговороте углерода изучение влияния техногенных загрязнителей окружающей среды на метанотрофы является актуальной задачей.

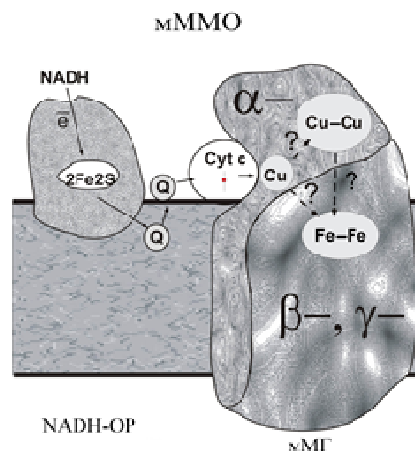


Рис. 1. Предполагаемые пути переноса электронов от NADH-OP в активный центр рМГ в мембране *M. capsulatus* (М) и *M. capsulatus* (Bath) [Гвоздев и др., 2008].

Обозначения: α , β , γ – субъединицы рМГ; Cu – моноядерный, Cu-Cu – биядерный медные центры, расположенные в α -субъединице; М-М – предполагаемый биядерный Fe-Fe центр рМГ, расположенный в β -субъединице, на котором происходит окисление метана до метанола; NADH-OP и Cyt c – неинтегральные мембранные белки; 2Fe2S – железосерный центр NADH-OP; Q – убихиноны; Cyt c – цитохром c.

В данном исследовании проведено изучение влияния тяжелых металлов (сульфаты Cu (II), Ni(II), Co(II), Zn(II), Fe(II)) на активность мМГ и NADH-OP из метаноокисляющих клеток *Methylococcus capsulatus* (штамм М).

Выделение NADH-OP проводили из надосадочной фракции полученной после осаждения разрушенных клеток и фрагментов мембран *M. capsulatus* (М). Активность мМГ в составе мембран определяли по скорости окисления пропилена до окиси пропилена в присутствии в качестве восстановителя NADH или duroхинола методом газожидкостной хроматографии. Активность NADH-OP определяли спектрофотометрически по скорости восстановления йоднитротетразолия хлорида до формазана в присутствии NADH [Гвоздев и др., 2008].

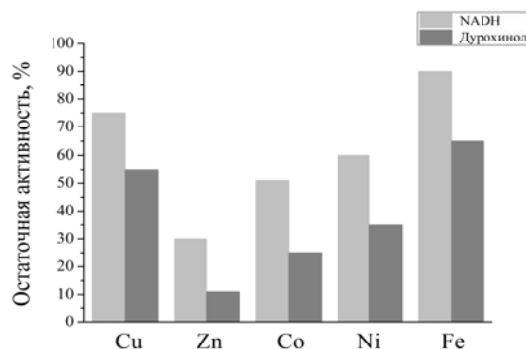


Рис. 2. Остаточная ферментативная активность мембран *M. capsulatus* (М) в реакции окисления пропилена в присутствии 100 мкМ металлов.

Все исследуемые металлы приводили к снижению скорости окисления пропилена, катализируемое мМГ. Наибольшая остаточная активность наблюдалась для Cu и Fe (рис. 2). При этом активность мМГ, определяемая с использованием duroхинола в

качестве восстановителя была несколько ниже по сравнению с NADH. Такая же зависимость наблюдалась и в контрольном эксперименте (в отсутствии металлов).

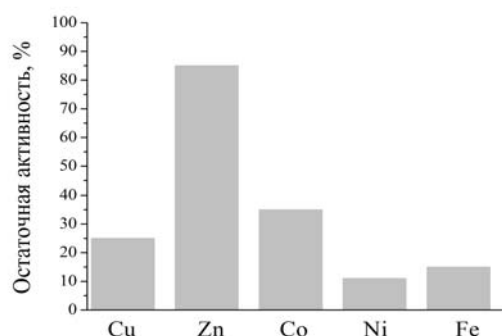


Рис. 3. Остаточная ферментативная активность NADH-OP *M. capsulatus* (M) в присутствии 10 мкМ металлов.

Для мМГ NADH не является непосредственным восстановителем [Гвоздев и др., 2008]. Но электрон-транспортная цепь мММО начинается с окисления NADH (рис. 1). В связи с этим было проведено исследование влияния изучаемых металлов на активность NADH-OP. При тех же концентрациях металлов (100 мкМ) наблюдалось полное ингибирование NADH-OP и денатурация фермента. Для проведения эксперимента концентрация металлов была снижена в 10 раз. Среди изученных металлов только Zn не оказывал существенного влияния на NADH-OP (рис. 3).

Таблица.

Влияние солей металлов, пестицидов и комплексов лонтрела с металлами на НАДН-оксидоредуктазу

Ингибитор	I_{50} , М	V_{max} , М·сек ⁻¹	S_1 , М (НАДН)	$K_i \cdot 10^4$ М НАДН	Т/и	V_{max} , М·сек ⁻¹	S_2 , М (НТ)	$K_i \cdot 10^4$ М НТ	Т/и
лонтр	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$1,23 \cdot 10^{-3}$	1,00	к	$1,88 \cdot 10^{-6}$	$6,98 \cdot 10^{-4}$	7,42	б
зенкор	$5,0 \cdot 10^{-4}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	0,25	к	$0,23 \cdot 10^{-6}$	$3,39 \cdot 10^{-4}$	8,94	б
базагр	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	12,80	б	$0,26 \cdot 10^{-6}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$	8,40	б
раунд	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{-6}$	$6,17 \cdot 10^{-4}$	22,00	н	$0,21 \cdot 10^{-6}$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	42,9	б
кузагар	$2,7 \cdot 10^{-2}$		$9,86 \cdot 10^{-3}$	14,00	к		$5,72 \cdot 10^{-3}$	159	к
сетокс.	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$7,59 \cdot 10^{-4}$	397,5	н		$11,00 \cdot 10^{-3}$	8,04	к
тачигар	$2,7 \cdot 10^{-3}$		$2,47 \cdot 10^{-3}$	21,00	к		$5,30 \cdot 10^{-3}$	4,55	к
тилт	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$5,98 \cdot 10^{-4}$	23,00	н		$13,00 \cdot 10^{-3}$	1,52	к
MgL ₂	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-6}$	$8,97 \cdot 10^{-4}$	12,67	н		$23,83 \cdot 10^{-3}$	3,55	к
MnL ₂	$3,0 \cdot 10^{-3}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	3,80	к	$1,72 \cdot 10^{-6}$	$1,81 \cdot 10^{-3}$	22,3	с
ZnL ₂	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$8,22 \cdot 10^{-4}$	10,19	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$	2,46	с
CuL ₂	$3,3 \cdot 10^{-4}$		$32,88 \cdot 10^{-3}$	0,06	к	$0,44 \cdot 10^{-6}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	4,01	н
CoL ₂	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-6}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	13,73	н	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	13,1	с
NiL ₂	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$	12,36	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$3,11 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
FeL ₂	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$8,97 \cdot 10^{-3}$	1,13	к	$1,54 \cdot 10^{-6}$	$2,20 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
MoL ₂	$8,5 \cdot 10^{-4}$		$19,72 \cdot 10^{-3}$	0,13	к		$47,62 \cdot 10^{-3}$	0,41	к
Cu(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	3,92	1,15	с		13,19	0,67	к
Mo(am)	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$	3,03	8,83	с		6,60	4,40	к
Mn(ac) ₂	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$9,66 \cdot 10^{-7}$	1,15	0,014	б		8,80	0,02	к
Fe(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$2,75 \cdot 10^{-6}$	4,55	14,23	к		4,40	4,13	к
Ni(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$7,66 \cdot 10^{-7}$	3,17	0,88	с		14,66	0,70	к

Пестицид или комплекс – без ингибитора: $V_{max}=7,40 \cdot 10^{-6}$ М·сек⁻¹; $S_1=6,58 \cdot 10^{-3}$ М; $S_2=2,65 \cdot 10^{-3}$ М.
Соль – без ингибитора: $V_{max}=2,75 \cdot 10^{-6}$ М·сек⁻¹; $S_1=1,54 \cdot 10^{-4}$ М; $S_2=3,30 \cdot 10^{-4}$ М. Тип ингибирования (Т/и):
 к – конкурентный; н – неконкурентный; б – бесконкурентный; с – смешанный

Результаты подробного исследования действия на NADH-OP пестицидов, солей металлов и комплексов гербицида лонтрел с металлами [Саратовских и др., 2005, 2007] представлены в таблице.

Показано, что как по донору, так и по акцептору электронов, так и соединения ведут себя по-разному. Однако с разными константами все они ингибирует NADH-OP. Очевидно, что происходит присоединение функциональных групп субстрата и ингибитора к разным местам активного центра фермента. Антиредуктазная активность возрастает при переходе от соли к пестициду и к комплексу. В поведении солей определяющим фактором является ион металла и строение его электронных оболочек, поэтому рассмотренные соли металлов не конкурируют с NADH за место связывания. В комплексах металлов доминирующим влиянием обладает лигандное окружение. Пиридиновое кольцо имеет строение близкое к NADH, т.е. способно занять место субстрата на белке, а атом азота может отдать неподелённую пару электронов. Изменение координационной сферы металла (лигандного окружения), приводит к кардинальным изменениям в характере ингибирования. Выше нами показано, что металлы в комплексах проявляют высокие степени координации могут образовывать полимерные цепочки, где лиганд выполняет роль «мостика»: L-M-L-Fe-NADH-OP, согласно рис. 4.

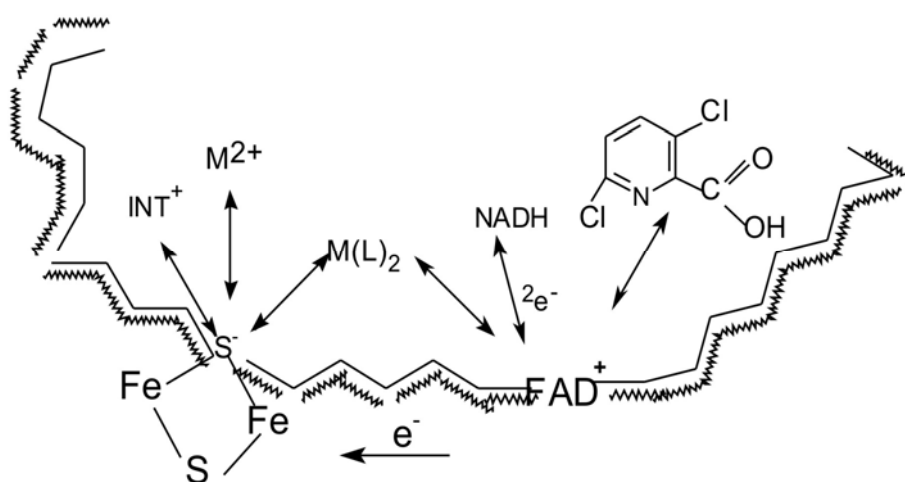


Рис. 4. Схема направлений атаки токсикантов в активном центре NADH-OP [Саратовских и др., 2007].

В целом соли металлов, пестициды и комплексы гербицида лонтрел оказали ингибиторный эффект на NADH-OP, что может служить механизмом их токсического действия по отношению к метанооксиляющим бактериям.

Литература

Гвоздев Р.И., Тухватуллин И.А., Туманова Л.В. Очистка и свойства мембраносвязанной метангидроксилазы из *Methylococcus capsulatus* (Штамм М) // Известия АН, серия биологическая. – 2008. – № 2. – С. 186–195.

Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазной реакции гербицидами и фунгицидами различного строения // Известия АН. Сер.хим. – 2005. – № 5. – С. 1284–1289.

Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Рощупкина О.С., Скурлатов Ю.И. Кинетика и механизм ингибирования ферментативных процессов металлами // Химическая физика. – 2007. – Т. 26, № 8. – С. 46–53.

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы. – Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. – 205 с.

Aimen H., Khan A.S, Kanwal N. Methanotrophs: The Natural Way to Tackle Greenhouse Effect // Journal of Bioremediation & Biodegradation. – 2018. –V. 9. – P. 432.

Lieberman R.L., Rosenzweig A.C. Crystal structure of a membrane - bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane // Nature. – 2005. – V. 434. – P. 177–182.

Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard J.S., Nordlund P. Crystal structure of a bacterial nonheme iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane // Nature. – 1993. – V. 366. – P. 537–543.

NADH AND ITS ROLE IN INACTIVATION OF TECHNOGENIC POLLUTION OF ENVIRONMENT

L.V. Avdeeva, E.A. Saratovskikh

Institute of problems of chemical physics RAS, Chernogolovka, Russia,
tuman@cat.icp.ac.ru

Abstract. In this study, the effect of heavy metals (Cu, Ni, Co, Zn, Fe) on MMO from *Methylococcus capsulatus* (strain M): pMH and NADH-OR has been studied. It was shown that metal cations have an inhibitory effect on this enzymes. The greatest inhibition of enzymatic activity was observed for NADH-OR. Probably the same effect can be expected for other NADH-dependent enzymes.

Keywords: *NADH, heavy metals, pesticide, enzymatic activity*